

職員の家族（健康者）は、殺菌乳のみを飲用していた。農園の主人、その妻、作業員2名は動物と接触をしていたが、生乳の飲用者はおらず、発熱やセロコンバージョンを示した者はいなかった。」

「大部分の患者が直接農場との接触していないことがわかっており、粉塵により感染した可能性は除外できる。寄生虫による伝播も、被拘束者に一切寄生虫感染者がいないことから除外できる。この事例については食品による感染以外に説明はできない。そしてこの問題の食品として可能性がある物質は生乳であった。」

上記文献には刑務所と農場が隣接していたことが記述されている。果たして、粉塵による伝播の可能性は本当に除外できるのだろうか。この他にも経口感染の重要性を強調するグループがある。以下2つの論理が用いられている。

・リケッチアの進入経路により症状が異なると考えているグループがいた [La Scola *et al.* 1997, Norlander 2000]。例えば、De Alarcon *et al.* [2003] は以下のように記述している。

「*C. burnetii*の吸入が肺炎の原因となったこと [Tiggert and Benenson 1956, Marrie *et al.* 1988, Domingo *et al.* 1999]、また生乳の消化がヒトにおいて肝炎の原因となることが証明された [Fishbein and Raoult 1992, Tissot-Dupont and Raoult 1993]。」

つまり、この仮説によれば、疾患の病態が肝炎である場合、汚染食品の摂取を疑わねばならない、としている。後述するが、これが誤りであることが証明されている。

・最近のエピソードとして、患者に対する質問をしたところ、多くの者が生乳または生乳製品を摂取しているとしている [Marmion and Stoker 1958, Connolly *et al.* 1990, Fishbein and Raoult 1992, Brouqui *et al.* 1993, Hahn and Koch 1993, Tissot-Dupont and Raoult 1993, Tselentis *et al.* 1995, Suarez-Estrada *et al.* 1996, Serbezov *et al.* 1999]。後述するが、この種の推論は確実な疫学的手法に基づいて初めて可能なのだが、ここでは行われていない。

次の引用は、この意見の支持者が引用した結論である [Fishbein and Raoult 1992]。

「*C. burnetii*の経口感染は生じうるが、エアロゾルによる感染よりも影響は少ない。しかし、Q熱患者、あるいは不顕性感染者が、加熱殺菌していない乳製品を摂取した場合、加熱殺菌していない乳製品に伝播されたほかの感染症がQ熱に加わると考えられるため、あらゆる乳製品を殺菌するよう勧告するべきである。」

次のような意見もある。

「これまで我々が行った主に実験に基づく疫学的観察により、肺チフス (typhus pulmonaire) (つまりQ熱) の (動物における) 経口感染が可能であることが証明される。今後、ヒトへの自然感染方法を調べねばならない」 (Combiesco 1957)。

「乳などの汚染食品の摂取により、感染およびセロコンバージョンを引き起こし、特定の状況において疾患を招く。しかしこの特定の状況について、現在まだ定義されていない。」 [Atelier du 2-5 septembre 1988 à l'Université Justus -Liebig de Giessen, cité dans une opinion officielle sur la fièvre Q par (Weise 2003) ]。

「乳の摂取は珍しい原因ではあるが可能性はある」 [Benson *et al.* 1963, Suarez-Estrada *et al.* 1996, Anonyme 2002e, 2003d, Rousset *et al.* 2003]。

「しかし感染に至る必要量は非常に多い」。研究所で使用される腹膜感染の10,000倍である。(Durand and Limouzin 1983, Rousset *et al.* 2003)。

「経口感染も除外はできないが、これは公衆衛生上問題とはならない」  
ここで論理は複数の形を呈する。

「汚染乳の摂取によるヒトの感染症例は非常に少ないことが知られている。ヒトは消化器感染する場合もあるが、この場合顕在化することは少ない。これは乳に含まれる抗体が非常に多いことに起因すると考えられる」 (Acha and Szyfres 1989)。「ヒトへの感染は、例外的に高病原性の乳または肉の摂取を原因とすることがある」 (Anonyme 2003b)。

1,383例の感染に関する後ろ向き研究から「感染経路が疾患の病態を決定するという仮説は肯定されなかった」 (Raoult *et al.* 2000)。

「食品の吐出および吸引後の摂取」が疾患の原因となる可能性がある (Anonyme 2003d)。

「ボランティアへの試験は証拠とならなかった」。つまり、3カ月間、感染したウシの生乳を摂取した成人受刑者群中35%が血清学的に陽性であり、一方、殺菌乳のみを消費した対照群である隣接刑務所の受刑者では8.9%のみ、入院患者群の4%のみが血清学的に陽性であったものの、Q熱発症に至った者は一切いなかった [Benson *et al.* 1963]。Stiles [2002] が引用したKrumbiegel [1970]も、研究においてボランティアが汚染乳を摂取したところ、感染が発生しなかったため、同様の結論に至った。

「最近研究された集団発生はすべて、汚染エアロゾルの吸引、またはダニの刺咬を原因とする」 (Anonyme 2003e)。1947～1999年にかけてドイツにおいて記録されたエピソードについても同様である。「感染したウシへの曝露、およびこのウシの乳中の細菌の排泄について、1950

年のEC内の事例において少し触れられている」が、当該時期の集団発生はすべて吸引または感染動物との接触により説明される [Lyytikäinen *et al.* 1997, Hellenbrand *et al.* 2001]。フランスにおける集団発生についても同様の説明がなされている [Armengaud *et al.* 1997, Tissot-Dupont *et al.* 1999, Baret, Dos Santos *et al.* 2000; Vincent and Desjardins 2001, Anonyme 2002a, Benoist *et al.* 2002, Re S Vianez-Gaide *et al.* 2003]。特に2002年のシャモニーでの集団発生についても同様である [Benoist *et al.* 2002]。また、アメリカ [Mcquiston and Childs 2002]、イギリス [Pebody *et al.* 1996]、日本 [Anonyme 2002b]、オーストラリア [Mak *et al.* 2003] においても同様であった。

「セロコンバージョンは、生きた *C. burnetii* の細胞を摂取した証拠とはならない」。

スペインのアンケートではこう指摘している。

「農場由来の乳または乳製品の摂取は面接者中20%を記録し、すべての症例が沸騰乳を飲む者であった。こうした摂取習慣を持つ者 (52%) の方が、乳または乳製品を消費しない者 (38%) よりも *C. burnetii* 抗体の保有比率が有意に高いことが検出された (オッズ比OR=1.83、95%CI=1.1~3.06、 $\chi^2=5.33$ 、 $p=0.02$ )。」 [Suarez-Estrada *et al.* 1996]。

「相関は証明とはならない」。上記の研究の多くにおいて、著者が、患者に対して行った疫学的な質問は数が限られている。大部分が、農場に行く頻度、職業、動物との接触、出産期の動物との接触などを尋ねるほか、生乳やチーズの摂取などに関する質問を1つか2つしている程度であった (生の製品か否かを正確に尋ねていない場合もあった)。正確な回答数が報告されていなければ、文字通りに受け止めることはできない。しかし、これが現在まで行われていることなのである [Marmion and Stoker 1958]。結果が不完全であったり、統計学や疫学上の手法に則っていない場合、批判は免れない。Raoult *et al.* [2000] の研究がまさにそうであり、その調査は注目を集めてはいるが、患者が動物と直接または間接的に接触したかを明確にすることなく、23.2%の患者が生乳チーズを摂取したを指摘している。また、オッズ比 (OR) が計算されているが、明確な結論を出すことができず、乳製品による感染の仮説を棄却することができる。また Hatchett *et al.* [2001] は、ニューファンドランドのヤギについてQ熱の相関研究を行った。殺菌乳の摂取 (OR=1.07、 $p=0.022$ ) の他、殺菌乳で製造されたヤギチーズの摂取 (OR=5.27) および喫煙 (OR=3.27) が、セロコンバージョンにより検知された感染と有意に相関している。ロジスティック回帰により、これら最後のリスク要素のみが、感染と有意に相関した。しかし、本当にこれが原因病原体だったのだろうか。著者ら自身も「現在のところ、これは疫学的相関の1つでしかない。というのは、*C. burnetii* は、ヤギチーズから発見されなかったからである」と述べている。また、「熱殺菌により、実際に乳中のコクシエラは死滅する」とも指摘している。Fishbein and Raoult [1992] は、グループ化された症例研究において、ヤギに接する者と非殺菌乳製品に曝露する者の陽性率に有意差はないが、動物に接する者と生の乳製品に曝露される者については有意であることを発見している。したがってテストは説得力を欠き、前の例同様に乳製品に責任を帰す論理は十分ではない。

## 資料 補遺II

熱による *Coxiella burnetii* の破壊

微生物学専門委員会 (CES Microbiologie) の報告書の抜粋

本セクションでは多くの場合、加熱により毎秒一定数の細菌集団が減少する、つまり毎秒の破壊比率が同じである、と見なしていることをまず記しておく。破壊速度は、最初の位である<sup>3</sup>。この現象の記述に使用するパラメータを1桁の減少とし、これを記号をDとする。

集団を90%減少させる特定の温度での加熱時間(分または秒で表す)とし、10で割るものとする。温度の影響をパラメータzとする(無名数)。Dを10で割ると温度上昇が得られる(摂氏または華氏で表す)。

工業において行われるように、数カ月あるいは数年の間、多くの製品ユニット<sup>4</sup>に熱処理を行う場合、加熱を耐えた望ましくない微生物が必ず1個以上残ってしまう。

この比率を求める式は以下の通りである。

$$P = C_0 \times V \times 10^{-t/D}$$

上記の式において、 $C_0$ は生製品における望ましくない微生物の当初の濃度、 $V$ は包装ユニット量、 $D$ は加熱温度での望ましくない微生物減少時間(桁)、 $t$ は加熱時間を表す。他の式により、工業的熱処理中の温度変化を考慮することも可能である(Cerf 2001)。

したがって熱殺菌基準、つまり時間と温度の組み合わせを選ぶにあたり、以下のことがわかっているなければならない。

- ・ 関連する微生物のDおよびzの特徴。
- ・ 製品の包装・販売されるユニット量V。
- ・ 当該微生物の生存を許容する上記ユニット中の比率P。

微生物の特徴は問題解決の主要な要素であり、ユニット量は商業上の問題であるが、病原体となる微生物を残す販売ユニットの許容比率の選択については、食の安全目標<sup>5</sup>(食品安全目標〈FSO : Food Safety Objectives〉)を定める公衆衛生に係る管轄当局が責任を持つ。

[ [Huebner RJ *et al.* 1949]

*C. burnetii* は高温殺菌では死滅するが(連続、71.5℃で15秒以上)、低温殺菌では生き残った(個

別、61.7°Cで30分以上) (Lennette et al. [1952] の引用)。

#### [ [Kirberger 1951]

実験者はマウスを次の方法で感染させた(湯煎した乳0.5 mlを試験管に入れる)。C. burnetii は55°Cまたは60°Cで30分後、あるいは1時間後も生存していたが、65°Cでは15分後に死滅した(Wegener [1957] の引用)。

#### [ [Bingel and Engelhardt 1952]

乳の人工植菌の後(植菌材料は乳中に1:20で希釈)、モルモットの発熱測定により、85°Cで5秒後、80°Cで7秒後または14秒後、70°Cで60秒後にC. burnetiiが認められた。精巢の顕微鏡観察時、85°Cで20秒後、14秒後、7秒後、75°Cで60秒後、または62°Cで30分後にC. burnetiiが認められた(Wegener [1957] の引用)。

Bingel and Engelhardt [1952] の原著論文を注意深く読むと、慎重に数字を取り扱っていることがわかる。

「我々が行った加熱殺菌によって(85°Cで7秒)すべてのCoxiella burnetiiが一挙に死滅しないとしても、大きく不活化させることから、(検出のための動物への)移動時の生存比率は元材料の1:20,000の希釈と同等となるほど低い。生き残ったCoxiella burnetiiに他の性質的ダメージが生じている可能性もある。毎回、高濃度材料(最低感染量の1,000倍)の不活化が大きく進むため、モルモットに典型的な発熱は見られず、精巢においてもCoxiella burnetiiの発育は極めて弱い。

乳の汚染率50%の場合も、感染量は酪農家の混合乳において消滅し、モルモットに対する病原性はなくなる。こうした感染量は汚染の希釈のおかげで、加熱殺菌により完全に不活化される。なお、Coxiella burnetiiの食品起源の病原性は弱く、たとえ酪農場での集乳時にCoxiella burnetiiを含有する乳を心配しなければならないときであっても、殺菌乳を健康に危険と見なす理由は一切ない。

実際の使用にあたって、コクシエラ感染乳の熱殺菌は不活化するのに十分である」。

#### Lennette et al. [1952] が引用したMarmion et al. [1951] の研究

67.8°C~68.9°Cで15秒間の処理により、自然感染乳におけるC. burnetiiは破壊されるが、人工感染させた、モルモットの10<sup>5</sup>倍の感染量を含む乳は破壊されない。70.0°Cまたは70.6°Cで15秒の加熱後でも陽性のままであったが、71.7°Cで15秒加熱後、陰性となった。[Lennette et al. 1952]

- <sup>3</sup> 速度が最初の位でない場合については本セクションの終わりに述べる。
- <sup>4</sup> つまり、1kgの食品を含む、箱、瓶、ダンボールなど、ユニットと同一量の包みまたは包装。
- <sup>5</sup> 「食品の消費時に、適切な水準で健康を保護できる、（細菌の）危険性に関する最大頻度および濃度」（コーデックス委員会において定義を協議中）

また実験者は混合乳の研究を行い、61.7℃以上で30分の個別低温殺菌、また71.1℃以上で15秒間の連続高温殺菌の前後について、*C. burnetii*の陽性標本数を比較した。バクテリアの存在をモルモットの腹膜注射後のセロコンバージョンにより確認した。低温殺菌の後、97%の標本において*C. burnetii*が消滅していた。しかし、62.2℃で30分の処理を行った757リットルの標本においては陽性のままで、アルカリホスファターゼ陽性となり、加熱が不適切であることを証明した。高温殺菌の後、95%の標本は陰性であった。一方は73.9℃で17秒間処理し、他方は15.2秒間処理した。この時間は、熱殺菌の密閉部に最低置かれる時間である。研究者は、殺菌が不十分であった可能性がある」と結論を出している。

#### [ [Wegener 1957]

Wegenerは、特にBingel and Engelhardt [1952] など、過去の文献を詳細に調べ、以下のように結論を出している。

「ドイツにおいて、自然感染乳への加熱殺菌で*C. burnetii*が破壊されるかという問題について、全体的に研究者の結果に相違がある。殺菌乳における研究では、バクテリアが全滅しないことを示している。その他、実際に、より高い温度と強い希釈が必要な場合、KästliおよびSchoopの結果から、温度境界の低い部分、あるいは少し高い程度の温度を殺菌条件として選んではならないことを示している。しかし、この問題についての不確かさはまだ残る。」

Wegenerは論文を執筆中、下記のアメ리카での研究についてまだ知らなかった。

#### [ [Anonyme 1957 ; Enright et al. 1957a, b]

上記研究者達は、モルモットについて2回実験を行い、生存する*Coxiella burnetii*の検出技術を精密化した。農場の乳109件をテストし、うち8件が陽性であった。また、複数の農場の混合製品である小売りの乳またはクリーム376件については、14件が陽性であった。これら汚染製品における*Coxiella burnetii*の最大量はモルモットの感染量の1,000倍であった。感染した18頭のウシの乳のうち（試験数137件）、5件がモルモットの感染量の1,000倍、5件が100倍、5件が10倍、5件が1倍であった。人工感染させたウシの乳はモルモットの感染量の10,000倍であった。熱耐性の研究にあたって、研究者は、モルモットの感染量の100,000倍の乳を使用している。

熱耐性測定の前回のシリーズは、実験室において60.6~66.1℃で行ったが、直線回帰の設定により高温での推定が可能である。表1は結果をまとめたものである。表に記す2つのシグマ（典型的間隔は2倍）は直線回帰による信頼区間内の調整である。この時代、61.7℃の低温殺菌（個別）、71.1℃の高温殺菌（連続）が推奨されていた。



表1：実験室の結果より得られた直線回帰に基づく、適切な温度に対する時間

温度 (°C)	直線回帰		
	50%の破壊ポイント	最低破壊時間	破壊の最低時間 及びおよび2つのシグマ
61.7	29.39分	33.02分	46.03分
62.8	16.29分	18.31分	25.42分
71.1	11.7秒	13.2分	20.4秒
71.7	8.7秒	9.8分	15.4秒
71.2	6.6秒	7.3分	11.6秒

2つ目の測定シリーズは68.1~72.8°Cの連続加熱殺菌器で行われた。結果は実験室で得られた結果を立証した。

研究者らは、感染したウシにおいて発見した最も汚染の激しい乳の10倍の汚染乳を採用し、また典型的間隔の2倍以上の時間・温度の組み合わせを、回帰直線から生じる組み合わせにより調整するよう推奨し、「完全な生乳から、*C. burnetii*を除去するため適切な」数値を推奨することができる」と論じている。その組み合わせは以下の通りである。

145°F (62.8°C) で30分、または161°F (71.7°C) で15秒。

こうした高い熱耐性（モルモットの50%の感染量を2で割った時間、および温度の影響）を初めて採用した上記研究以降、議論は収まった。すべてのマニュアル、国際酪農連盟（Fédération internationale） [Staal 1986]、その後のコーデックス委員会 [Anonyme 2003c] は、以下の推奨を行っている。

63°Cで30分、または72°Cで15秒。

この組み合わせ、またはこれら2つの温度の内挿により得られた均衡のある組み合わせが、これ以降全体的支持を得て、世界中で使用されている。アメリカの規則は、外挿により得られた100°C 0.01秒の組み合わせを許可している [Anonyme 2002d]。脂肪分含有率が自然乳よりも高い場合、温度を数度上げるように勧告されている。アメリカでは、脂肪分含有量が10%以上の場合、殺菌温度を3°C (5°F) 上げねばならない。

Cerf [2001] が記す式を使用し、以下のEnright et al. [1957a] の結果を引き出すことができる。

78

$D_{72^{\circ}\text{C}}=1.35$ 秒

$z=4.28^{\circ}\text{C}$

したがって72°Cで15秒殺菌する場合、11桁の削減、つまり99.999999999%の*C. burnetii*集団の破壊ができる(15を1.35で割った結果)。この数字を*Clostridium botulinum*の加熱殺菌保存食に求められる12桁の削減に近づけねばならない。これは、*Mycobacterium tuberculosis*の破壊について求められる4~5桁の削減の数字よりもかなり高い(Nénot *et al.* 1958)。

ただし、上記の論理は、熱による*C. burnetii*の破壊速度が最初の位であるとの仮説に基づいていることを忘れてはならない。*C. burnetii*の破壊速度を対象とした研究は一切なく、したがって生存曲線が完全な直線であること、また5桁以上の削減の外挿が完全に正当であるとは証明されていない。熱処理時間が長くなると、破壊速度が極度に減速される、あるいは完全に停止する(これはありえないと考えられる)ような二相性の速度が存在するとの最悪の仮説においても、熱処理がこの5桁の削減に導くことに疑問を呈す理由はない。公衆衛生管轄当局は病原菌が残存する販売ユニットの許容可能な比率を公表していないため、1957年以降使用されている時間・温度の組み合わせを、問題視してはならないと考える。

#### [ [Anonyme 1997]

1985年8月6日付「食用未加工乳が遵守せねばならぬ衛生基準に係るアレテ」(1985年8月29付フランス共和国官報にて公示)では、食用未加工乳は「1年以上Q熱臨床例がない農家」由来のものでなければならないとしている。

上記アレテを参照としつつ、1997年、現行の下記の農業省食品総局通達が施行された。

#### 第2条ノ1°b

1) 乳によりヒトに感染可能な動物伝染病

中略

c) その他疾患

Q熱：家畜がQ熱を発症する場合、衛生認証を受けた生乳生産者が行うべき措置

- ・流産した動物の乳は、人間の飲用を目的として、集乳、処理、加工、販売をしてはならない。上記農家の当該動物以外の乳は「高温殺菌」、すなわち85°Cで30秒間の処理を行わねばならない。

同通達は義務ではないものの厳密な適用が求められているが、以下の解釈を前提としている。

- ・Q熱は乳からヒトへ感染しうると見なしている。

- ・ *C. burnetii*の熱耐性に係る1957年以降の国際的コンセンサスを考慮しておらず、Bingel and Engelhardtが過剰であると判断した、1952年の研究基準よりさらに高い基準を定めている。
- ・ *C. burnetii*の排泄が明らかとなっていない動物の乳に対しても同基準を要求している。

この問題に複数のページを割いた文献中に、以下の記述がある [Notermans S ; Barendsz AW *et al.* 2002] 。

「(リスク定量評価の) 注目すべき例がEnright *et al.* [1956, 1957] の研究であり、Q熱の病原体である *Coxiella burnetii* に対する保護として適切な水準の乳の殺菌能力基準を設定している。(中略) この研究は工程基準を定めるにあたって、リスク評価原則を早期に用いたものである。」

能力基準はリケッチアの破壊率に関するものであり、工程基準は推奨する時間・温度の組み合わせである。

我々は Notermans S, Barendsz AW *et al.* [2002] の意見を支持する」。

鶏卵からの Q 熱感染リスクの検討

分担研究者	岸本壽男	国立感染症研究所ウイルス第一部第五室	室長
協力研究者	安藤秀二	国立感染症研究所ウイルス第一部第五室	主任研究官
	荒川香南子	同	流動研究員
	小川基彦	同	主任研究官
	柳 陳堅	同	流動研究員
	佐藤 梢	同	協力研究員
	棚林 清	国立感染症研究所獣医科学部第三室	室長
	藤田 修	同	研究員
	堀田明豊	同	研究員
	宇田晶彦	同	研究員
	山本茂貴	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部	部長
	貞升健志	東京都健康安全研究センター 微生物部	主任研究官
	平井昭彦	同	主任研究官
	甲斐明美	同	科長
	諸角 聖	同	部長
	百田隆祥	栄研化学株式会社 生物化学研究所	研究員
	小島 禎	同	課長
	池戸正成	同	部長

研究要旨：近年の鶏卵や関連食品の Q 熱コクシエラ(*Coxiella burnetii*, *C.burnetii*)汚染の指摘を踏まえ、高感度な検出方法の開発と汚染実態調査を進めてきた。平成 16 年度は、まず抽出法について、感染研で前年度検討したカラム抽出法と、より迅速に多検体を処理できる DNA 抽出機を用いた鋳型 DNA 抽出法を比較検討した。次に内閣府食品安全委員会に J 民間研究所から提出された卵の汚染を指摘する報告書に示されている抽出法 (J 法) を再現し、先のカラム抽出法ならびに DNA 抽出機による抽出法と卵黄からの DNA 抽出効率について比較した。卵黄に精製菌をスパイクして行った DNA 抽出法の比較では、卵黄の 5.9%NaCl-PBS 処理後のカラム法も DNA 抽出機を用いた方法も J 法に比較して 1,000 倍以上抽出効率がよく、昨年度と同様に鶏卵一個あたり *C.burnetii* 3,400 個の検出感度であった。そのため、今回は新たな抽出法を用いて市販鶏卵 506 個について検討したが、*C.burnetii* 特異遺伝子は検出されなかった。栄研化学(株)生物化学研究所においても、卵からの DNA 抽出法(栄研法)の検討を引き続き行い、16 年度は、栄研法と J 法との比較検討を行った。その結果、栄研法で 1,700 個/卵黄 1 個が検出可能であり、一方、J 法では、100,000 個/卵黄 1 個であった。今後は抽出法についても、J 民間研究所の方法を再現して感度の比較を行う予定である。また、東京都健康安全研究センターにおいても、昨年同様に市販鶏卵から nested PCR による *C.burnetii* 特異遺伝子の検出を行い、300 個についてはすべて陰性であった。したがって前年度とあわせて、これまでに本研究で調査した計 1,021 個の市販卵からは *C.burnetii* 特異遺伝子陽性のものは認めなかった。以上のことから鶏卵の *C.burnetii* 汚染率は確認できず、存在したとしても人への感染リスクは低いと考えられた。

A.研究目的:近年、鶏卵や関連食品の一部がQ熱コクシエラ *C. burnetii*に汚染されているとの指摘があり、鶏卵等の *C. burnetii*による汚染実態を調査・検証し、感染リスクを検討する必要が生じている。本年度は、汚染卵が販売されているとする報告の検体処理法を再現し、昨年度我々が確立した方法と比較し、報告を検証することを第一の目的とした。さらに、鶏卵材料をより大量に迅速に処理できる検体処理法を確立し、より広範囲の市販鶏卵について検討し、感染リスクを把握することを目的に調査を実施した。

## B.研究方法

材料と方法:

### 1. *Coxiella* 菌株

*Coxiella burnetii* ホルマリン不活化精製 II 相死菌の粒子を昨年度と同様に計測し、国立感染症研究所(感染研)および栄研化学(株)生物化学研究所(栄化研)における卵からの DNA 抽出法の効率比較試験に使用した。

### 2. DNA 抽出法の検討

昨年度のスピンカラムを用いた抽出キット(QIAGEN QIAamp DNA mini)に加え、磁気ビーズを用いた抽出装置による DNA 抽出を検討した。詳細は以下の通りである。

#### ①カラム法と DNA 抽出機の抽出効率の検討

PBS10 $\mu$ L に 1,000 個から 0.1 個の精製菌を浮遊させたものから DNA を抽出し、カラム抽出法と DNA 抽出機による抽出法の抽出効率を比較した。カラム法は、昨年度と同様に抽出キットの手順に準じて実施した。DNA 抽出機による抽出は、菌浮遊液 10 $\mu$ L を終濃度 1mg/mL の ProteinaseK を Lysis buffer(TOYOBO MagExtractor Genome)に追加したもの 850 $\mu$ L を加えてよく混和し、

56 $^{\circ}$ C、2 時間可溶化した。続いて 96 $^{\circ}$ C、10 分加熱して、DNA 抽出機(KingFisher mL, Thermo Electron Co.)による DNA 抽出に供した。DNA 抽出機の処理プログラムは、試薬を TOYOBO MagExtractor Genome を用いた場合に最も抽出効率がよくなるよう Thermo Electron Co.により至適化され、DNA 抽出機にあらかじめ登録されたプログラムによって実施した。DNA 抽出液はいずれの方法においても 100 $\mu$ L に抽出し、その 5 $\mu$ L を Real Time PCR に供した。これは一反応あたり 50 個から 0.005 個の精製菌から抽出した DNA に当たる。

#### ② *Coxiella* 菌をスパイクした卵黄からの抽出効率の検討

・感染研での検討

卵黄 500 $\mu$ L あたり 1 個から 10,000 個の菌をスパイクし、各種抽出方法により抽出効率を比較検討した。昨年度のカラム法は図 1 に示すとおり、500 $\mu$ L の卵黄を 5.9%NaCl-PBS で前処理し、QIAGEN QIAamp DNA mini kit の手順に従って行った。また、同様の前処理を行った卵黄からのペレットを上記と同様に 1mg/mL の ProteinaseK を Lysis buffer に追加したものを 850 $\mu$ L 加えて処理し、DNA 抽出機を用いて鑄型 DNA の抽出を行った(図 2)。

J 法の再現確認は図 3 に準じて実施した。J 法では、2g の卵黄に 0.1%Tween20-PBS を加えて低速、高速遠心によりペレットを回収する。そのペレットをさらに 1%NP40、1%Tween20、10mM Tris-HCl(pH8.0)を用いて混和、洗浄、ペレットの回収を行い、ProteinaseK を追加した Lysis buffer(TOYOBO MagExtractor Genome)に溶解。上記と同様に DNA 抽出機を用いて以後の抽出処理を行う方法である。ペレットが十分に小さくならない場合には NP40、Tween20、Tris-HCl 処理を追加している。ただし、J 法で用いた DNA 抽出機

KingFisher(Thermo Electron Co.)は抽出効率99%、処理量20から200 $\mu$ L、今回使用した機種KingFisher mLは抽出効率95%、処理量50から1000 $\mu$ Lと、仕様が異なるため(図4)、最終的に抽出されうるべきDNA量が同量になるように菌をスパイクした卵黄2.6mLを抽出材料し、KingFisher mLに至適な量850 $\mu$ LのProteinaseK追加Lysis bufferにより卵黄ペレットを溶解させ、DNA抽出機に供した。さらにJ法の再現試験と同量の2.6mLの卵黄をNaCl-PBS処理し、KingFisher mLによる抽出も行った。

#### ・栄化研での検討

栄化研においても、昨年度、鶏卵からの*C.burnetii* 特異遺伝子検出のための処理法について検討し、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen社製)を用いたDNA抽出法を確立した(図5,6)。本年度はJ法と比較検討を行った。

昨年度報告した栄研法で*C.burnetii* II相菌の死菌を用いて添加回収実験を行った結果、遺伝子増幅系理論値(最終的に調製した抽出液の内、反応液5 $\mu$ L中の菌量を計算し、その検出感度を比較したもの)を比較した。また実際の卵添加で、添加した菌体の回収結果を比較した。検出はLAMP法にて行った。

### 3. *C.burnetii* 特異遺伝子検出 Real time PCR

昨年度構築した系のうち、最も感度ならびに特異性がよかったomp1とIS2のプライマー・プローブを用いたTaq Man Real time PCRにより*C.burnetii* 特異遺伝子の検出を行った。

### 4. 市販鶏卵のQ熱コクシエラ汚染調査

#### ①感染研での調査材料

感染研では、初年度に引き続き以下のように市販鶏卵を試供卵とした調査を行った。卵黄

500 $\mu$ LをNaCl-PBS前処理した後、TOYOBO MagExtractor GenomeとKingFisher mLを用いて鋳型DNAを抽出し、*C.burnetii* 特異遺伝子の検出を行った。Real Time PCRの内因性陽性コントロールは、同研究所細菌第一部の小泉博士より分与いただいた同じ反応条件で反応するレプトスピラのプライマー、プローブならびにレプトスピラDNAを用いた。

供試した市販卵は、関東圏内スーパーで購入した以下の506個である。(表1)

#### ②東京都健康安全研究センターでの市販鶏卵の調査

都内で流通する鶏卵300個を材料とした。使用した鶏卵の製造地域は、千葉県(100個)、茨城県(80個)、群馬県(40個)、埼玉県(40個)、栃木県(20個)及び青森県(20個)である。

昨年度同様、平井らの方法に準じ、鶏卵から*C.burnetii* 特異遺伝子の抽出を行った。すなわち、無菌的に鶏卵より卵黄部を採取後NaCl濃度1Mのphosphate buffer(PB)を等量加え、ストマッカーによりよく粉碎した。その乳剤10mLを分取し25,000 $\times$ G、30分間遠心した。

遠心沈渣にlysis solution(2%SDS、10mMTris-HCl(pH8.0)、10mMEDTA)150 $\mu$ L、10mg/ml proteinase K 15 $\mu$ Lおよび20mg/ml glycogen 0.4 $\mu$ Lを加え、混和後、56 $^{\circ}$ C1時間タンパク質を消化した。その後、NaI溶液300 $\mu$ L、イソプロパノール600 $\mu$ Lを加えて混和し、-30 $^{\circ}$ Cで30分低温放置した。

次に、21,600G、10分間遠心し、得られた沈渣を乾燥後、TE(10mM Tris-HCl、pH8.0、1mM EDTA)50 $\mu$ Lに溶解し、DNAテンプレートとした。抽出DNAテンプレート10 $\mu$ Lを材料に、com1領域のnested-PCR法により、

*C.burnetii* 特異遺伝子検出を試みた。

## C.研究結果

### 1.カラム法と DNA 抽出機の抽出・検出効率の検討

カラム法によって抽出したものは一反応あたり 0.5 から 5 個、DNA 抽出機を用いて抽出したものは一反応あたり 5 個の DNA が検出される抽出効率であり、昨年度のカラム法の方が若干抽出効率が優れていた (表 2)。

### 2. *Coxiella* 菌をスパイクした卵黄からの抽出・検出効率の検討

#### ・感染研での検討結果

カラム法による卵黄 500  $\mu$ L からの Q 熱コクシエラ特異的遺伝子の検出は、昨年度と同様、卵一個当たり 3,400 個の菌を検出できた。また、カラム法と同様に NaCl-PBS 処理した 500  $\mu$ L の卵黄を ProteinaseK を追加した Lysis buffer 処理し、DNA 抽出機を用いて DNA の抽出を行ったものからも同様に卵一個当たり 3,400 個の菌を検出できた。一方、2.6ml の卵黄を用いる J 法による抽出検体は、Tween20、NP40 による卵黄の前処理を行ってもペレットの大きさは小さくならず、ペレットを 50  $\mu$ L 程度の容量にするには、Lysis buffer を加える前のペレット化処理を 3 回以上繰り返す必要があり、卵一個あたり 340,000 以上の菌が検出に必要であった。さらに、NaCl-PBS による前処理を行っても、供する卵黄量が増えると昨年度の報告と同様に抽出効率が低下した (表 3)。

#### ・栄化研での検討結果

昨年度報告した栄研法 (図 5,6) では、*C.burnetii* II 相菌の死菌を用いて添加回収実験を行った結果、遺伝子増幅系理論値で 12.5 個/assay (5  $\mu$ L)、実際の卵添加では 1,000 個/卵黄 10mL (卵 1 個の卵黄量を 17ml とすると

1,700 個/卵黄 1 個) が検出可能であり、添加した菌体と同等の回収結果が得られた。一方、J 法では、遺伝子増幅系理論値で 75 個/assay (5  $\mu$ L)、卵黄 1 個あたりの検出感度 100,000 個/卵黄 1 個であった。

### 3.市販鶏卵の Q 熱コクシエラ汚染調査

#### ①感染研での調査結果

関東圏のスーパーで販売されていた鶏卵 506 個から *C.burnetii* 特異遺伝子の検出を試みた結果、検出された鶏卵はなかった。

#### ②東京都健康安全研究センターでの調査結果

都内流通市販鶏卵 300 個から *C.burnetii* 特異遺伝子の検出を試みた結果、検出された鶏卵はなかった。

## D.考察

本年度は、昨年度開発した TaqMan 法による Real Time PCR での *C.burnetii* 特異遺伝子の検出法に加えて、より多くの検体を安定かつ迅速に処理するための検体からの鑄型 DNA の抽出法の改良を行った。DNA 抽出機を用いた方法は、カラム法による方法より若干の抽出効率の低下が見られたものの、昨年度と同様、一個の鶏卵卵黄あたり 3,400 個の *C.burnetii* を検出することが可能であった。多数の検体の処理が必要な場合、カラム法は抽出のための最終的な鑄型 DNA の作製まで一個ずつ処理しなければならないため、人為的誤りやコンタミネーションの危険性が増加し、抽出時間も長くかかる。本年度試みた DNA 抽出機による鑄型 DNA の作製は、卵黄からの抽出効率はカラム法のそれとほぼ同じであり、上記の問題を極力避けることが可能となった。

一方、市販鶏卵の *C.burnetii* 汚染の根拠とされている J 民間研究所の報告書の抽出法を再現したところ、抽出・検出効率は鶏卵一個当た

り 340,000 個以上の菌の DNA が必要であり、きわめて抽出効率が悪かった。栄化研での検討結果でも、栄化研法の 1,700 個/卵黄 1 個に比べ、J 法では、卵黄 1 個あたりの検出感度 100,000 個と抽出効率が悪かった。

今後は、効率よく抽出される鋳型 DNA について、J 法における検出法である SYBR Green Real Time PCR (Roch LightCycler) の反応産物を nested PCR 法によって検出する方法を再現し、その遺伝子検出効率について比較検討を行う予定である。

市販鶏卵の汚染調査については、より安定的で効率的な鋳型 DNA 抽出法が確立できたことから、本抽出法と昨年度確立した TaqMan 法 Real Time PCR によって、506 個について調査したが、汚染鶏卵は認められなかった。東京都健康安全研究センターでも 300 個の市販鶏卵を nested PCR 法で調査したがすべて陰性であった。したがって前年度とあわせて、これまでに本研究で調査した計 1,021 個の市販鶏卵からは *C.burnetii* 特異遺伝子は認めなかった。この結果は陽性率が高い J 私立研究所の報告書の内容とは大きく異なるが、その理由については不明である。

#### E. 結論

鶏卵からの *C.burnetii* 特異遺伝子抽出法については、再現した J 法の効率は、感染研法、栄化研法に比べて著しく低かった。今後は検出法についても J 法を再現して比較を行う予定である。

これまでに実際に調査した市販鶏卵は計 1,021 個に上るが、*C.burnetii* 特異遺伝子陽性のもは認められず、鶏卵の *C.burnetii* 汚染率は確認できなかった。今回の結果から、さらに卵由来の食品について検討する意義は低いと考えられ、今後は死籠り卵等の検討などを行う予定である。

#### F. 健康危険情報

今回の解析からは、*C.burnetii* に汚染された卵は検出しなかった。検出限界以下の汚染がないとはいえないが、存在したとしても人への感染リスクは低いと推測された。ただし、健康被害の有無の結論には至っていない。

#### G. 研究発表

##### 1. 発表論文

1) 平井昭彦, 金子誠二, 仲真晶子, 石崎直人, 小田桐 恵, 甲斐明美, 貞升健志, 新開敬行, 矢野一好, 諸角 聖: 市販牛乳の *Coxiella burnetii* 汚染状況および鶏卵中の *C. burnetii* 検査法の検討, 食衛誌 (投稿中)

##### 2. 学会発表

1) 平井昭彦, 金子誠二, 仲真晶子, 石崎直人, 小田桐恵, 甲斐明美, 貞升健志, 新開敬行, 村田以和夫, 諸角 聖: 市販牛乳中の *Coxiella burnetii* 汚染状況および鶏卵中の *C. burnetii* 検査法の検討, 第 137 回日本獣医学会学術総会、2004 年 4 月

2) 貞升健志, 新開敬行, 金子誠二, 平井昭彦, 仲真晶子, 石崎直人, 小田桐恵, 甲斐明美, 村田以和夫, 諸角 聖: マヨネーズ中の *Coxiella burnetii* 検査法の検討, 第 137 回日本獣医学会学術総会、2004 年 4 月

3) Momoda, T., Ogawa, M., Kojima, T., Ikedo, M., Sato, K., Setiyono, A., Kishimoto, T.: Sensitive and Rapid Detection of *Coxiella burnetii* by Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP), a Novel DNA Amplification Method. American Society for Microbiology 104th General Meeting. New Orleans, LA, USA. May 24, 2004.



- 4)荒川香南子,小川基彦,安藤秀二,柳 陳堅,岸本寿男,貞升健志,平井昭彦,甲斐明美,諸角聖.Q熱コクシエラの鶏卵からの検出に関する研究. 第22回日本クラミジア研究会・第11回リケッチア研究会. 倉敷. 2004年10月23-24日
- 5)百田隆祥,小島 禎,池戸正成,小川基彦,佐藤梢,アグス・スティヨノ,安藤秀二, 荒川香南子,柳 陳堅,岸本寿男.LAMP法を用いた *Coxiella burnetii* の鶏卵からの検出法の検討. 第22回日本クラミジア研究会・第11回リケッチア研究会. 倉敷. 2004年10月23-24日
- 6)百田隆祥,小島 禎,池戸正成,小川基彦,佐藤梢,アグス・スティヨノ,岸本寿男.LAMP法を用いた *Coxiella burnetii* の検出.第15回日本臨床微生物学会総会.2005年1月24日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

表 1.市販鶏卵の Q 熱コクシエラ汚染調査(感染研での調査材料)

番号	商品名	生産者(包装者,所在地)	製造年月日(賞味期限)	購入日	検体処理日時
1-20	■■■■ たまご	(■■■■,千葉県)	(2005.1.19)	2005.1.11	2005.1.12
21-40	■■■■ パック LL	(■■■■,千葉県)	(2005.1.21)	2005.1.11	2005.1.12
41-50	■■■■ 卵	(■■■■,茨城県)	(2005.1.21)	2005.1.11	2005.1.12
51-90	■■■■ 鶏卵	(■■■■,埼玉県)	(2005.1.27)	2005.1.18	2005.1.19
91-130	■■■■	(■■■■,千葉県)	(2005.1.26)	2005.1.18	2005.1.19
131-150	■■■■ eggs	(■■■■,北海道)	2005.1.7(2005.1.21)	2005.1.18	2005.1.19
151-170	■■■■ 卵	(■■■■,青森県)	(2005.1.28)	2005.1.15	2005.1.19
171-190	■■■■ 卵	(■■■■,埼玉県)	(2005.1.28)	2005.1.15	2005.1.19
191-210	■■■■ たまご	(■■■■,同,福島県)	(2005.1.27)	2005.1.15	2005.1.19
211-230	■■■■ たまご	(■■■■,千葉県)	(2005.1.25)	2005.1.15	2005.1.19
231-250	■■■■ パック LL	(■■■■,千葉県)	(2005.1.22)	2005.1.11	2005.1.19
251-260	■■■■ 卵	(■■■■,茨城県)	(2005.1.21)	2005.1.11	2005.1.12
(260 欠番)					
261-280	■■■■ たまご	■■■■ (■■■■,茨城県)			
(270 欠番)			(2005.1.21)	2005.1.11	2005.1.12
281-300	■■■■	(■■■■,福島県)			
			2005.1.9(2005.1.23)	2005.1.11	2005.1.12
301-330	■■■■ たまご	(■■■■,埼玉県)	(2005.1.25)	2005.1.20	2005.1.21
331-340	■■■■ たまご	(■■■■,埼玉県)	(2005.1.31)	2005.1.20	2005.1.21
341-380	■■■■		(2005.1.30)	2005.1.20	2005.1.21
381-400	■■■■	(■■■■,埼玉県)	(2005.2.1)	2005.1.20	2005.1.21
(400 欠番)					
401-420	■■■■ 卵	(■■■■,神奈川県)	(2005.2.5)	2005.1.27	2005.1.28
(410,419,420,421,422 欠番)					
421-460	■■■■	■■■■ (同・青森県)			
(440 欠番)			(2005.2.3・6)	2005.1.27	2005.1.28
461-500	■■■■	(■■■■,青森県)	(2005.2.5)	2005.1.27	2005.1.28
(465,468,491 欠番)					
501-520	■■■■	■■■■ (同・茨城県)	(2005.2.27)	2005.2.15	2005.2.15
(501,520 欠番)					

\* 欠番は割卵時、卵黄採取前に卵黄のうがこわれたもの。

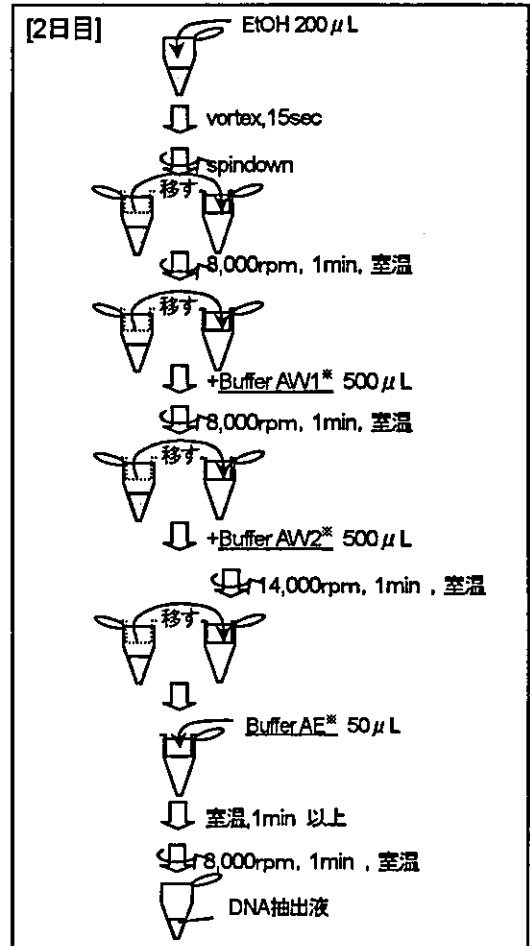
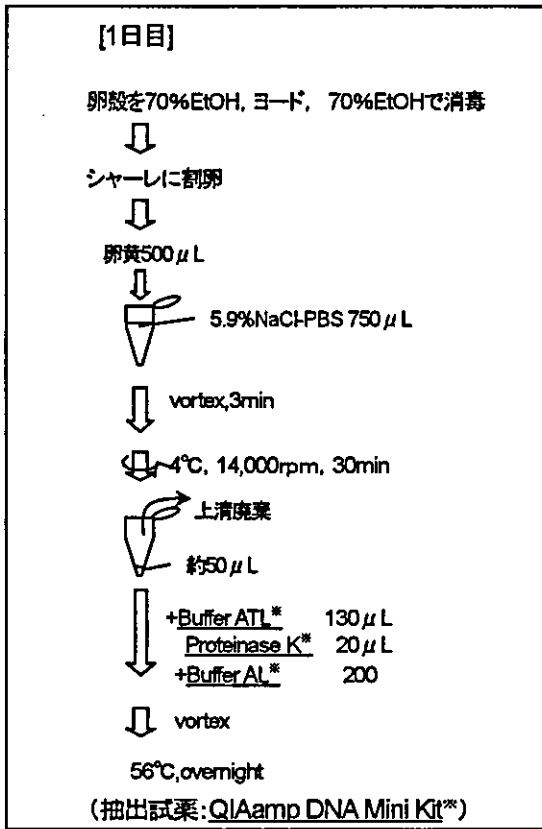


図1 卵からのDNA抽出  
 ~カラム法(平成15年度 感染研法)~

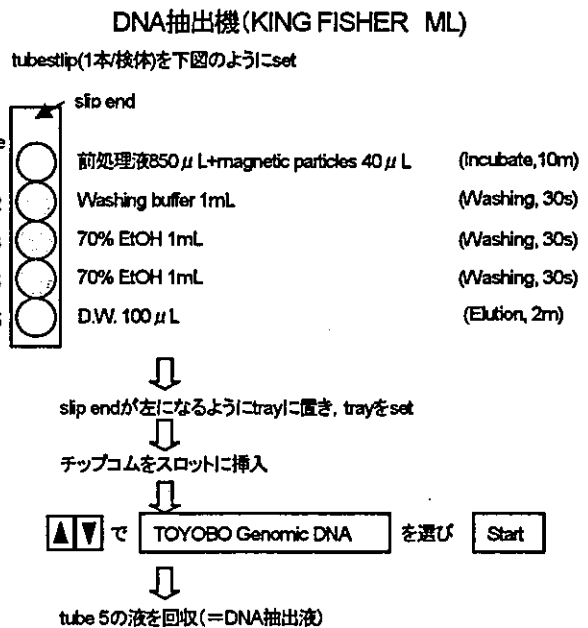
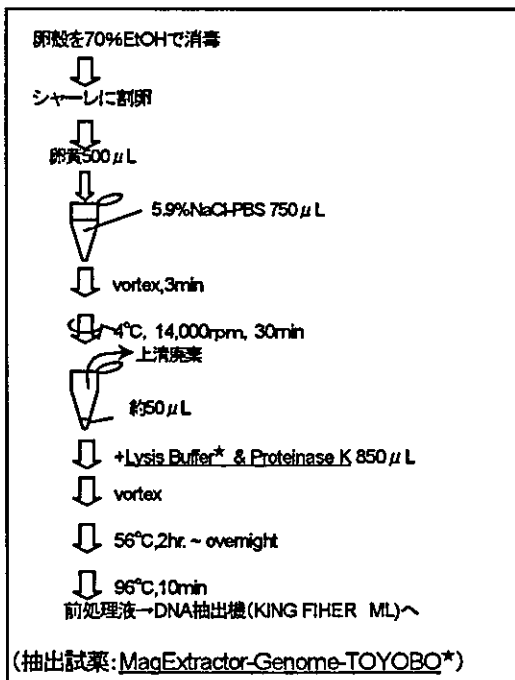


図2 卵からのDNA抽出~磁性粒子を用いたDNA抽出装置~

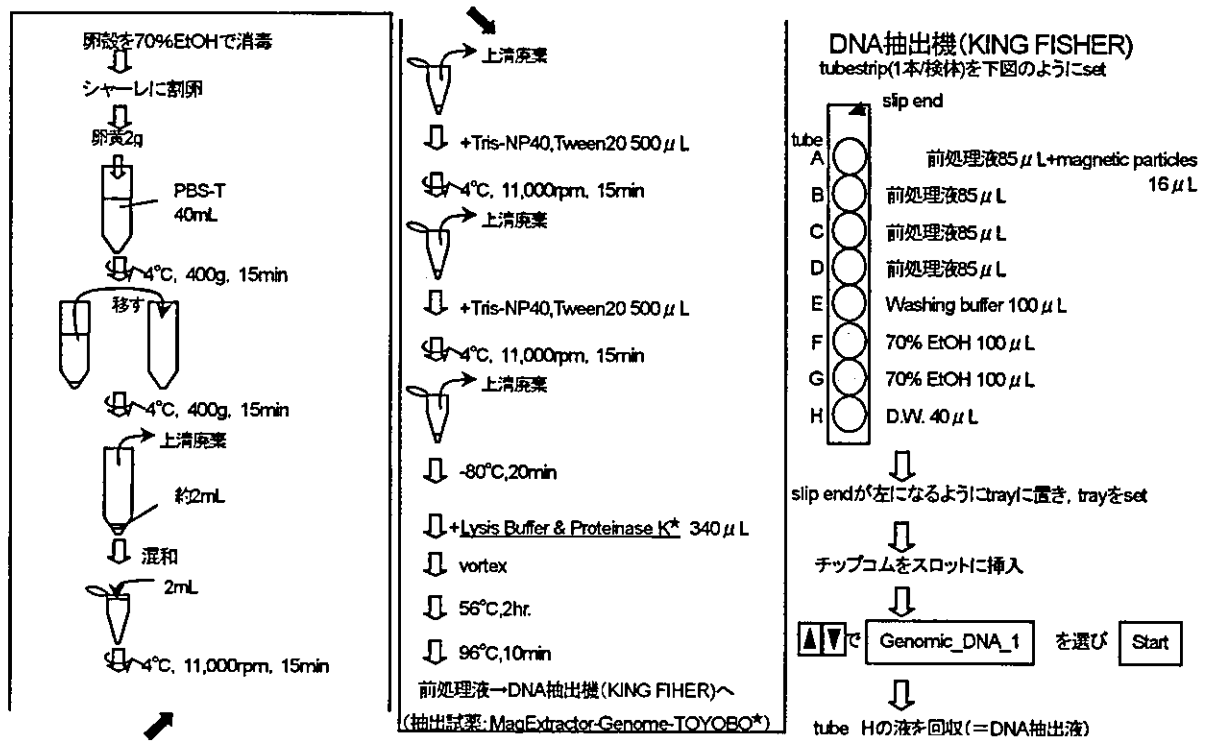


図3 卵からのDNA抽出～J法～(平成16年7月 内閣府食品安全委員会に提出された報告書より)

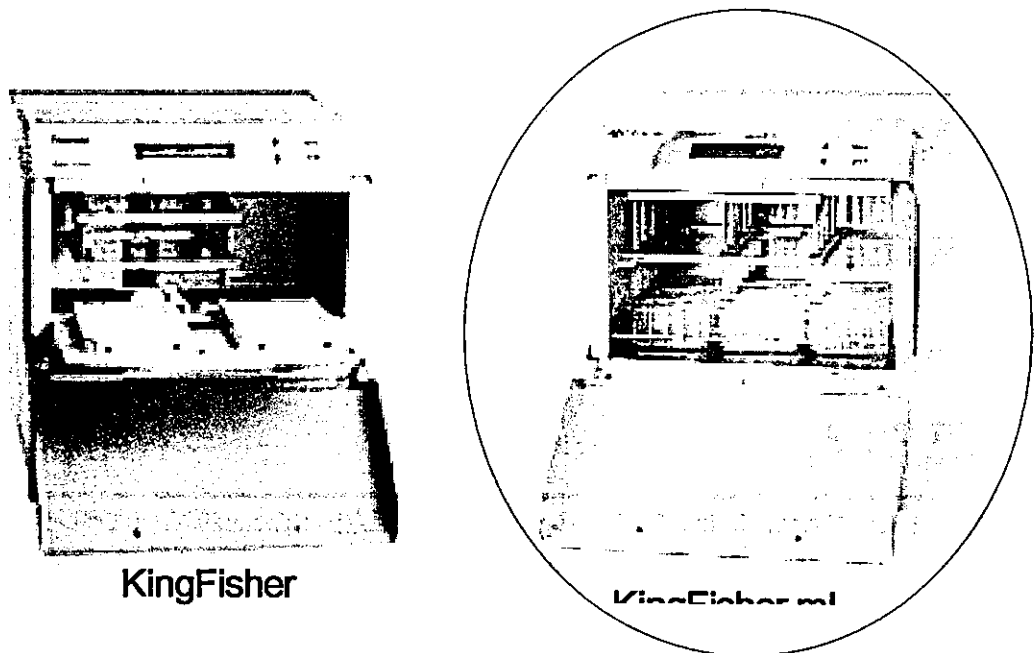


図4 Thermo Electron 社DNA抽出機